

## CAPLUS SEARCH &amp; DATABASE ENTRY.

s cs223295/pn

L1

=&gt; &lt; 11 1 max

L1 ANSWER 1 OF 1 CAPLUS COPYRIGHT 2006 ACS on STN  
 AN 1987:437938 CAPLUS  
 DN 107:37938  
 ED Entered STN: 08 Aug 1987  
 TI Polymer particles for measurement of phagocytosis  
 IN Vetvicka, Vaclav; Fornusek, Lubor; Kopecek, Jindrich  
 PA Czech.  
 SO Czech., 5 pp.  
 CODEN: CZXXA9  
 DT Patent  
 LA Czech  
 IC G01N033-54  
 ICA A61B010-00  
 CC 15-1 (Immunochemistry)  
 FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	CS 223295	B	19830915	CS 1981-9384	19811216 <--
				CS 1981-9384	19811216

## CLASS

PATENT NO.	CLASS	PATENT FAMILY CLASSIFICATION CODES
------------	-------	------------------------------------

CS 223295	IC	G01N033-54
	ICA	A61B010-00
	IFCI	G01N033-54; A61B0010-00 [ICA]

AB The phagocytic activity of human monocytes and granulocytes is measured with spherical hydrophilic polymer particles 0.05-3.0  $\mu$ m in diameter which show low nonspecific adsorption to cell surfaces and are stainable with routine microscopic stains, including fluorescent stains. A monomer mixture (5g) containing 77.8% 2-hydroxyethylmethacrylate, 0.1% ethylenedimethacrylate, 2% methylenediacrylamide, 0.1% poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] (mol. weight 70 kilodaltons), and 20% methacrylic acid was dissolved in 95

mL water. The solution was filtered, saturated with N<sub>2</sub>, sealed, irradiated with 10 k Gy Co  $\gamma$ -irradiation at room temperature, and the resulting particles of diameter about 0.9  $\mu$ m were washed and stored in water at 4°.

ST hydrophilic polymer particle manuf phagocytosis

IT Phagocytosis

(by granulocyte and monocyte of human, measurement of, with acrylic polymer microspheres)

IT Acrylic polymers, biological studies

RL: BIOL (Biological study)

(microspheres, phagocytosis measurement with)

IT Monocyte

(phagocytosis by, of human, measurement of, with acrylic polymer microspheres)

IT Spheres

(micro-, of acrylic polymer, phagocytosis measurement with)

IT 108926-53-0 108926-54-1 108926-55-2 108926-56-3 108926-57-4

RL: BIOL (Biological study)

(microspheres, phagocytosis measurement with)

=&gt;



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

223295

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 16 12 81  
(21) (PV 9384-81)

(40) Zveřejněno 31 12 82

(45) Vydáno 15 03 86

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>

G 01 N 33/54

//A 61 B 10/00

(75)  
Autor vynálezu

VĚTVIČKA VÁCLAV RNDr., PRAHA, FORNŮSEK LUBOR RNDr.,  
HVOZDNICE, KOPEČEK JINDŘICH ing. CSc., PRAHA

## (54) Imunoreagens

### 1

Vynález se týká použití mikročástic na bázi hydrofilních polymerů v imunologii, zejména pro stanovení fagocytární aktivity.

Fagocytóza je jako jeden z imunologických amplifikačních systémů významným prostředkem obrany organismu. Klinické testování úrovně fagocytózy se stává důležitým kritériem pro posouzení stavu imunity pacienta. Existuje dlouhá řada chorob, jež jsou doprovázeny nebo i přímo zapříčiněny defekty fagocytární schopnosti makrofágů a mikrofágů. Jde jednak o defekty primární, tj. přímo ve funkceschopnosti těchto buněk, zpravidla jejich cytoplazmatických membrán, a jednak defekty sekundární spočívající v dysfunkci opsonizačních či chemotaktických faktorů jako například při agammaglobulinémii, defektech komplementového systému, septických stavech, nádorových onemocněních atd.

V současné době se pro stanovení fagocytární aktivity používá řada metod založených na fagocytóze nejrůznějšího materiálu. U každé z dosavadních technik lze bohužel najít nedostatky, které ztěžují správnou interpretaci výsledků a znejasňují tento významný test klinické imunologie.

V klinické praxi se nejvíce používá metoda fagocytózy mikrokryсталů uhlíčitanu

### 2

kademnatého ( $\text{CdCO}_3$ ), kvasinek *Candida albicans* nebo *Saccharomyces cerevisiae*. Při použití mikrokryсталů  $\text{CdCO}_3$  jsou základem nedostatkem obtíže s přípravou standardní suspenze kadmiových mikrokryсталů, neboť při případném uvolňování volného kadmia dochází k prudké inhibici fagocytózy. Dalším nedostatkem tohoto postupu je závislost na autologním séru. V průběhu testu navíc dochází k určitému poškození buněk, takže interpretace výsledků je značně nespolehlivá. Nevýhody obou zbylých technik jsou společné: obtížná příprava fagocytovaných částic, nutnost jejich stálé kultivace, určitá nestandardnost metody v různém prostředí a též závislost na opsonizaci.

Jmenované nevýhody dosud běžně používaných postupů odstraňuje metoda podle vynálezu.

Předmět vynálezu spočívá v použití mikrosférických částic na bázi hydrofilních polymerů o velikosti 0,05 až 3,0  $\mu\text{m}$  jako imunoreagens pro stanovení vlastností a funkcí plasmatické membrány buněk zúčastňujících se imunitních procesů a pro separaci buněk.

Mikrosférické částice z hydrofilních polymerů o velikosti 0,05 až 3,0  $\mu\text{m}$  vhodné pro

použití v imunologii se připravují radiační polymerizací, účinkem  $\gamma$  záření z kobaltového zdroje, směsí složené z 90 až 99 % hmot. vody nebo její směsí s 0,01 až 20 % obj. alkoholu o počtu C atomů 1 až 4, 1 až 10 % hmot. monomerní směsí, složené z 25 až 99,5 % hmot. hydrofilních monomerů, 0,01 až 40 % hmot. ionogenních komonomerů a 0,1 až 35 % hmot. síťovadla a 0,01 až 2 % hmot. polymerního aditiva o molekulové hmotnosti 10 000 až 200 000 g/mol.

Jako hydrofilních monomerů lze použít glykolmonomethakrylát, glykolmonoakrylát, kde glykol znamená nejen prostý ethylen-glykol, nýbrž i propylenglykol, butylenglykol, jakož i diethylenglykol, triethylenglykol a další homologické polyglykoly; glycerinmonomethakrylát, N-monosubstituovaný methakrylamid, N-monosubstituovaný akrylamid, N,N-disubstituovaný akrylamid, kde substituent může být alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku, nebo hydroxyalkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, obsahující 1 až 2 OH skupiny; 4-vinylpyridin, 2-vinylpyridin, 5-vinyl-2-methylpyridin; akrylamid, methakrylamid.

Ionogenní komonomery jsou kyselina methakrylová, kyselina akrylová, kyselina itakonová, maleinanhydrid, diethylaminoethylmethakrylát, dimethylaminoethylmethakrylát, p-diethylaminostyren; methakryloyloxyethyltrimethylamoniumchlorid.

Jako síťovadla je výhodné použít glykol-dimethakrylát, kde glykol má výše uvedený význam; glykoldiakrylát, methylen-bis-akrylamid, ethylen-bis-akrylamid, trimethylolpropantriakrylát, triakryloylhexahydrotriazin.

Aditivum je s výhodou poly[N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid], dále je možno použít N-monosubstituovaný methakrylamid, poly N-monosubstituovaný akrylamid, poly N,N-disubstituovaný akrylamid, kde substituent může být alkyl s 1 až 3 atomy uhlíku, nebo hydroxyalkyl s 1 až 5 atomy uhlíku obsahující 1 až 2 OH skupiny, polyvinylalkohol, polyakrylamid, polyethylen-glykoly, polypropylenglykoly. Molekulová hmotnost aditiv je výhodně v rozmezí 10 000 až 200 000 g/mol.

Při polymeraci se postupuje tak, že směs monomerů (polymerizační směs) se naplní do polymerizační nádoby, například skleněné ampule, probublá dusíkem asi 15 až 20 minut, a zataví (nebo jinak utěsní). Za teploty 0 až 40 °C se ampule umístí do centra kobaltového zdroje a ozáří tak, aby dávka byla 2 až 30 k Gy. Po ozáření se ampule otevře, obsah 10× dekantuje nadbytkem destilované vody (dekantaci lze provést i ve dvou stupních, nejprve směsí ethanolu a destilované vody, poté destilovanou vodou) a uschová při 4 °C.

Výhodou tohoto způsobu polymerace je možnost přípravy čistých mikrosférických částic. To je důsledkem toho, že proces probíhá v nepřítomnosti iniciátorů či emulgátorů.

Principem nově navrhované metody je fagocytóza synteticky vyráběných částic. Tato metoda odstraňuje výše jmenované nevýhody dosud běžně používaných postupů. Příprava částic je standardní, vzniklá suspenze je naprosto homogenní a stálá (několik let). Protože jde o syntetický materiál, metoda není závislá na opsoninech.

Částice jsou sférické, homogenní velikosti, lze je připravovat v různých velikostech na základě pouhé změny koncentrace výchozích reagens. V základním provedení mají mírný negativní náboj, což vzhledem k negativnímu náboji buněk zajišťuje jejich nízkou nespecifickou adhezenci k povrchu buněk. Částice jsou snadno barvitelné běžnými barvicími technikami optické i elektro nové mikroskopie. Částice je možno značit fluorescentně a po tomto označení použít k detekci buněk pomocí fluorescenčních technik. Fluorescentní značení je možno provést běžně používanými postupy, například použitím fluoresceinisothiokyanátu nebo dansylallylaminu (v množství 0,01 až 5 % hmot.).

Částice obsahují volné funkční skupiny a je možno je dodatečně modifikovat pro specifickou vazbu ke zvoleným determinantům buněčných povrchů.

Zásobní suspenzi částic lze skladovat při teplotě 4 °C a lze ji uchovávat v neporušeném, tj. neaglutinovaném a nekontaminovaném stavu i bez sterilního zacházení či použití antibiotik či konzervačních látek minimálně 2 roky.

Trvanlivost suspenze byla ověřována na Imunologickém oddělení MBÚ ČSAV od prosince 1978 do listopadu 1981.

Při testu fagocytózy podle vynálezu se postupuje tak, že se 0,1 ml čerstvé periferní krve odebrané do heparinu (5 j/ml) smíchá s 0,05 ml částic dle příkladu 1 (naředěných na poměr 4 až 5  $\times 10^8$ /ml v pufovaném fyziologickém roztoku). Směs se ponechá inkubovat 60 minut při 37 °C za stálého třepání. Po inkubaci se provedou nátery na odmaštěná podložní skla a po obarvení metodou May-Grünwald-Giemsa se hodnotí. Jako pozitivní se hodnotí buňka s 3 a více fagocytovanými částicemi. Počítá se procento fagocytujících buněk celkově, % fagocytujících buněk určitého typu (FA) a fagocytární index fagocytů (FIF).

Výhody nového testu fagocytózy podle vynálezu jsou v tom, že metoda je rychlá, přičemž lze současně rutinně hodnotit krevní obraz. Metoda není přístrojově náročná a lze ji provést v rámci běžného vybavení laboratoře. K jednomu testu je potřeba pouze 0,1 ml periferní krve, což zabraňuje zbytečně vysokým odběrům krve, vedoucím často k dalšímu stresu dárce, což je důležité zvláště u dětí. Částice se barví při použití barvicí metody dle May-Grünwald-Giemsa do výrazné modra až modročervena, což umožňuje snadné odlišení od jádra a

cytoplazmy buněk. Metodu lze dále celostátně standardizovat, tento krok dosud používané techniky neumožňovaly. Metoda byla testována jednak na imunologickém oddělení MBÚ na zdravých dobrovolných dárcích a jednak na Klinice infekčních chorob nemocnice Na Bulovce na zdravých dárcích ve stáří 5 až 6 let a na dárcích (3 až 6 let) s otitis média chronica. Výsledky ukazují na rozdíl schopnosti fagocytózy buněk bílé řady krve nejen u mladých a dospělých dárců, ale i mezi zdravými a nemocnými jedinci. Podle dosavadních výsledků se tato metoda zdá být standardní, spolehlivá, levná a rychlá. Je tedy možno ji doporučit pro rutinní klinickou praxi.

V dalším je pomocí příkladů znázorněna příprava mikročástic a v tabulkách jsou uvedeny výsledky klinických testů.

#### Příklad 1

5 g směsi sestávající ze 77,8 % hmot. 2-hydroxyethylmethakrylátu, 0,1 % hmot. ethylendimethakrylátu, 2 % hmot. methylen-bis-akrylamidu, 0,1 % hmot. poly[N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu] o střední molekulové hmotnosti 70 000 g/mol a 20 % hmot. kyseliny methakrylové bylo rozpuštěno v 95 ml vody. Po přefiltrování byl roztok předložen do skleněné ampule, 15 minut probubláván čistěným dusíkem. Poté byla ampule zatavena. Směs byla za laboratorní teploty ozářena z kobaltového zdroje celkovou dávkou 10 k Gy. Po ozáření byla ampule otevřena, obsah vylit do Erlenmeyerovy baňky a opakovaně dekantován. Byly získány mikrosférické částice o průměru cca 0,9  $\mu\text{m}$ .

#### Příklad 2

3 g směsi sestávající z 50 % hmot. 2-

-hydroxyethylmethakrylátu, 8,5 % hmot. ethylendimethakrylátu, 40 % hmot. akrylamidu a 1,5 % hmot. poly[N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu] o střední molekulové hmotnosti 30 000 g/mol bylo rozpuštěno v 97 ml vody. Dále bylo postupováno jako v příkladu 1.

#### Příklad 3

5 g směsi sestávající z 77,9 % hmot. 2-hydroxyethylmethakrylátu, 0,1 % hmot. ethylendimethakrylátu, 2 % hmot. methylen-bis-akrylamidu a 20 % hmot. kyseliny methakrylové bylo rozpuštěno v 95 ml vody. Dále bylo postupováno jako v příkladu 1. Byly získány částice o průměru cca 1  $\mu\text{m}$ .

#### Příklad 4

4 g směsi sestávající z 76,7 % hmot. 2-hydroxyethylmethakrylátu, 10 % hmot. 2-(hydroxyethoxy)ethylmethakrylátu, 10 % hmot. diethylaminoethylmethakrylátu, 0,3 % hmot. ethylendimethakrylátu, 3 % hmot. (ethoxyethyl)dimethakrylátu bylo rozpuštěno v 96 ml vody. Dále bylo postupováno obdobně jako v příkladu 1.

#### Příklad 5

6 g směsi sestávající z 60 % hmot. 2-hydroxyethylmethakrylátu, 15 % hmot. N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu, 0,5 % hmot. ethylendimethakrylátu, 3,5 % hmot. methylen-bis-akrylamidu, 20 % hmot. 4-vinylpyridinu a 1 % hmot. polyethylenglykolu bylo rozpuštěno v 97 ml rozpouštědla sestávajícího z 90 % vody a 10 % methanolu. Dále bylo postupováno obdobně jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že celková dávka ozáření byla 7 k Gy.

Tabulka I

Vliv velikosti částic na stupeň fagocytózy:

	velikost částic $\mu\text{m}$	% fagocytujících monocyty	% fagocytujících granulocyty
A	0,35	63,7	58,4
B	0,45	57,9	66,7
C	0,8	55,2	68,7
D	0,9	66,7	65,8
E	1	60,2	69,2
F	1	60,0	64,7

Poznámka: částice A a B

jsou příliš malé pro tento test, horší rozlišení počtu pohlcených částic/l buňku, te-

dy méně vhodné pro fagocytózní test. A a B jsou určeny speciálně pro elektronovou mikroskopii.

Tabulka II

Porovnání některých metod rutinně používaných ke stanovení fagocytární aktivity.

	% fagocytujících leukocytů
Saccharomyces cerevisiae	44 až 62
CdCO <sub>3</sub>	13 až 15
T-7*	33 až 41
T-7 děti	17 až 20
T-7 pacienti** (děti)	7 až 8

Poznámka:

Hodnoty pro Saccharomyces a CdCO<sub>3</sub> jsou pro dospělé dárce.

\*částice podle příkladu 3;

\*\*otitis média chronica

Tabulka III

Průměrné hodnoty fagocytární aktivity buněk periferní krve u různých dárců.

Počet pokusů	Dárce*	% fagocytujících monocytů	% fagocytujících granulocytů	
13	R. P.	57,6	62,1	zdraví
	J. H.	44,2	59,9	dospělí
	$\bar{X}$ dospělí	46,0	60,0	
12	A. L.	38,3	28,0	zdravé
	P. H.	35,8	39,2	děti
	$\bar{X}$ děti (5 až 6 let)	38,8	32,6	
12	J. L.	25,4	11,1	nemocné
	P. P.	17,3	17,7	děti
	$\bar{X}$ pacienti (3 až 6)	20,1	13,5	

\* bylo sledováno 13 (12) dárců ve skupině; dva z nich jsou uvedeni jako příklad

Na přiloženém obr. 1 je znázorněn pozitivní makrofág (buňka vlevo) a dva negativní lymfocyty z peritoneálního výplachu myši. Barvení krystalovou violetí. Inkubace 60 minut, 37 °C, částice připravené dle příkladu 3.

Na obr. 2 jsou znázorněny jednotlivé fá-

ze fagocytózy mikrosférické částice myším peritoneálním makrofágem.

P — částice připravené dle příkladu 3

V — vakuola

Inkubace 60 minut, 37 °C

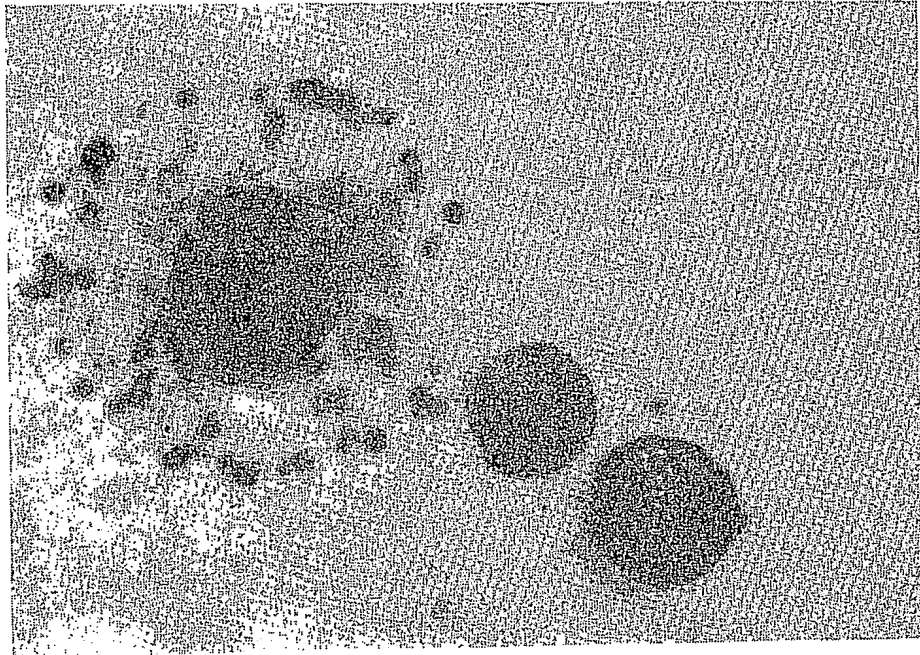
Elektromikroskopický snímek

#### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

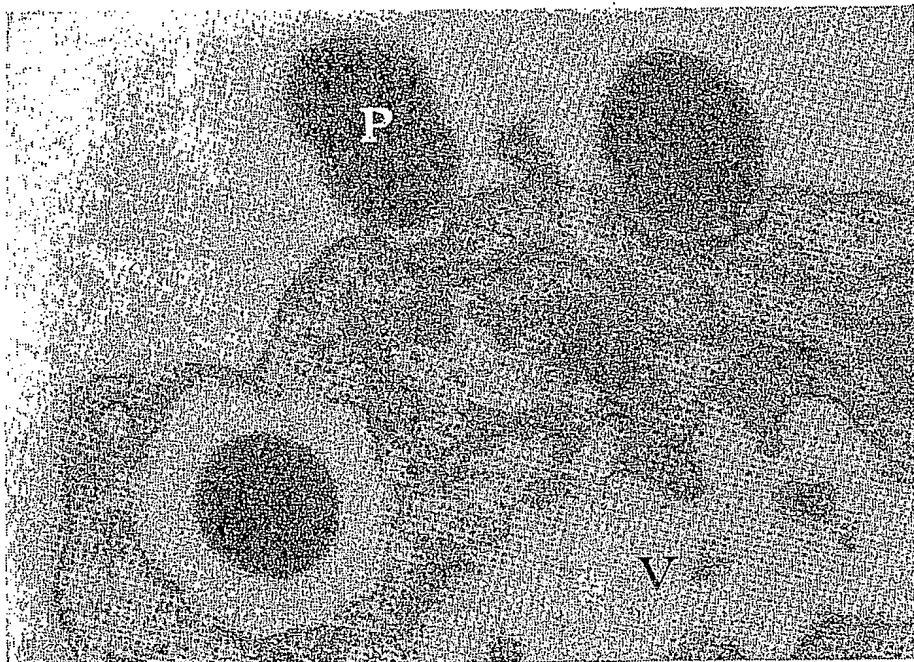
Použití mikrosférických částic na bázi hydrofilních polymerů o velikosti 0,05 až 3,0  $\mu$ m jako imunoreagens pro stanovení

vlastností a funkcí plasmatické membrány buněk zúčastňujících se imunitních procesů a pro separaci buněk.

1 list výkresů



Obr. 1



Obr. 2

